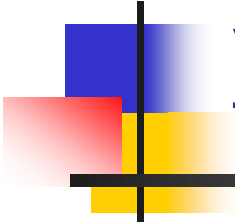


The TIR1 protein of *Arabidopsis* functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast Grr1p



Publikation von Max Ruegger, Elizabeth Dewey, William M.
Gray, Lawrence Hobbie, Jocelyn Turner und Mark Estelle
10. September 1997 in Genes & Development

Vortrag von Claudia Fink und Maike van Ohlen

Gliederung

- Einleitung
 - Gene der Auxinreaktion
 - Suche nach anderen Mutanten
 - Wirkt TIR1 über den Auxintransport oder die Auxinantwort?
 - Einfluss des *TIR1* Gens auf die Zellteilung
 - Einfluss des *TIR1* Gens auf die Zellstreckung
 - Zusammenhang zwischen AXR1 und TIR1
-
- Identifizierung des *TIR1* Gens
 - Sequenzuntersuchungen am TIR1 Protein
 - Ubiquitin-Pathway
 - Diskussion

Einleitung

Wirkung von Auxin (IAA)

- Zellstreckung
- Zellteilung
- Anlage von Wurzeln und Sprossen
- Induktion von Gefäßen
- Anlage und Entwicklung der Frucht
- Apikale Dominanz
- scheint sowohl an Zellmembran (wird hyperpolarisiert) als auch in der Zelle (Genexpression) zu wirken
- Mechanismus noch vollkommen unbekannt

Gene der Auxinreaktion

Begriffe

AXR =
Auxin resistant

- *AXR1*
- *AXR4*
- *AUX1*
- *SAR1*

Alle Mutationen reduzieren die Reaktion auf Auxin und verursachen Wachstumsdefekte.

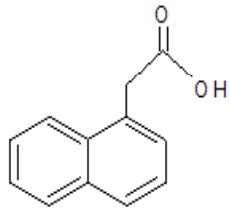
Suche nach anderen Mutanten

Begriffe

TIR1 = transport inhibitor
response1

Gen

NPA = 1-Naphthylelessigsäure
(Auxintransportinhibitor)



CPD = 2-Carboxyphenyl-3-
phenylpropan-1,2-dion
(Auxintransportinhibitor)

- Anzucht auf NPA und CPD (Inhibitoren des Auxintransports)

- 5 *tir1*-Mutanten gewachsen
- Wildtyp: verringertes Wurzelwachstum und Anschwellen der Wurzelspitze
- verschieden starke Auswirkungen auf Phänotyp

⇒ Mutanten beeinflusst im Auxinpathway

Genetische Charakterisierung von *tir1*-Mutanten

Table 1. Segregation of CPD resistance in a *tir1-2* × wild-type *F₂* population

<i>F₂</i> root length (mm)	<i>F₂</i> genotype ¹		
	<i>tir1/tir1</i> ²	<i>tir1/+</i> ²	<i>+/+</i> ²
17	2		
16	5		
15	1		
14			
13			
12		1	
11			
10		6	
9		6	
8		7	6
7		3	4
6		2	4
5			
4		1	
3		1	
Totals	8	27	14

¹Genotype determined by analyzing CPD resistance in *F₃* plants.

²Number of seedlings.

- Segregation von CPD-Resistenz in *F₁* und *F₂*

→ homozygote Mutante ist CPD-resistent

→ auch heterozygote *tir1*-Mutanten können auf CPD wachsen

⇒ Semidominanz

Roter Pfaden ???



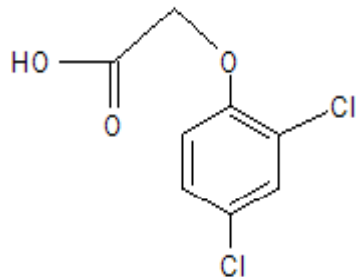
Wirkt TIR1 über den Auxintransport oder die Auxinantwort?

Begriffe:

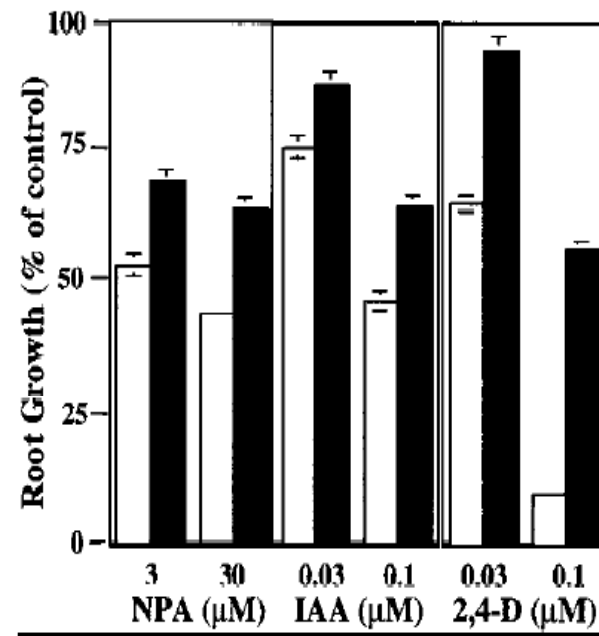
NPA = 1-Naphthylessigsäure
(Auxintransportinhibitor)

CPD = 2-Carboxyphenyl-3-phenylpropan-1,2-dion
(Auxintransportinhibitor)

2,4-D = 2,4-Dichlorphenoxy-essigsäure

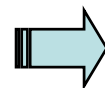


- Anziehen von WT-Pflanzen und *tir1*-Mutanten auf NPA, IAA und 2,4-D



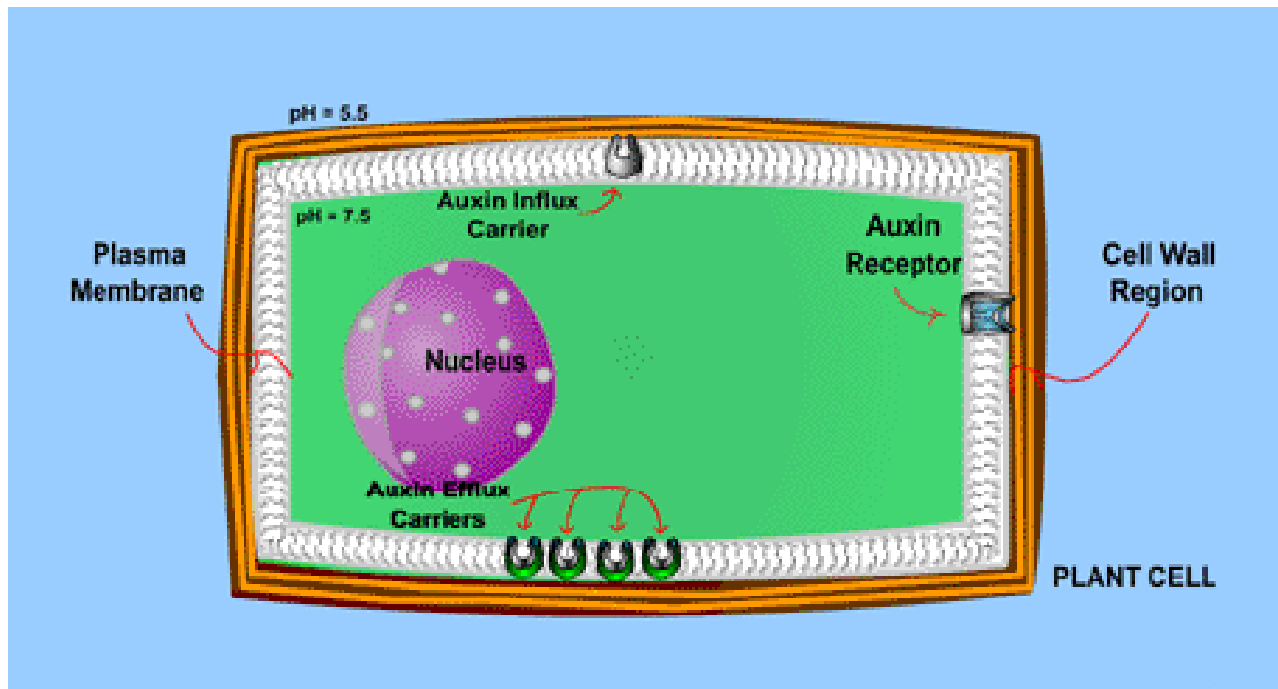
Weißer Balken: Wildtyp

Schwarzer Balken: *tir1-1*-Mutante



Effekt der Mutation primär auf Auxinantwort

Polarer Auxintransport



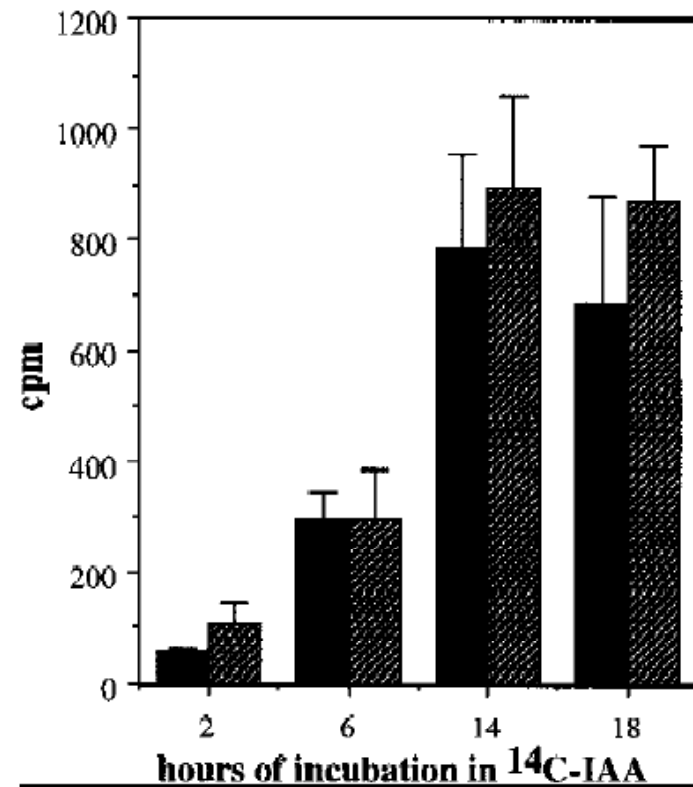
- regulierter Auxintransport (aktiv und gerichtet)
- Influx Carrier Protein und Efflux Carrier Protein
- NPA ist ein Effluxinhibitor
- Regulation durch Phosphorylierung der Proteine

<http://plantandsoil.unl.edu/croptechnology2005/UserFiles/Image/siteImages/5MajorAuxinBindingProteinsLg.gif>

^{14}C -IAA-Transportassay

- 2,5 cm lange Stücke des Hauptstamms abschneiden und apikales Ende in Nährlösung mit ^{14}C -IAA inkubieren
 - nach einigen Stunden am basalen Ende Scheibe abschneiden und mithilfe eines Scintillators die Radioaktivität messen
- schlechterer IAA-Transport bei Einsatz von NPA
- schlechterer IAA-Transport vom basalen zum apikalen Ende

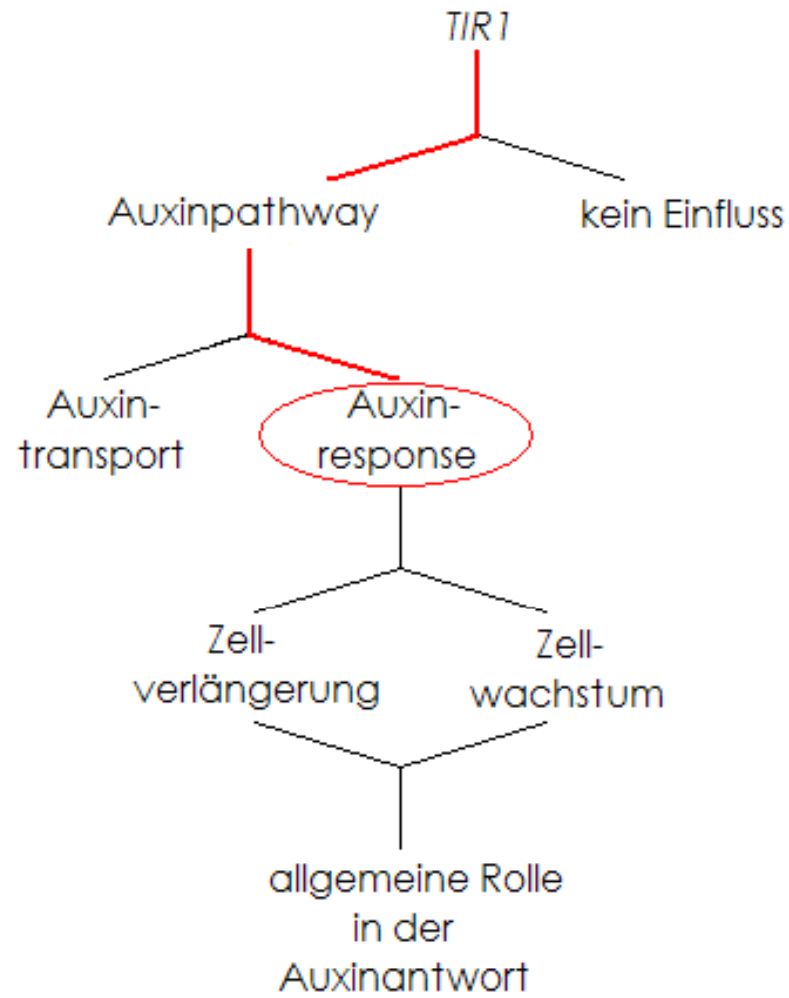
➡ *TIR1* wirkt sich nicht auf Auxintransport aus



Schwarze Balken: Wildtyp

Schraffierte Balken: *tir1-1*-Mutante

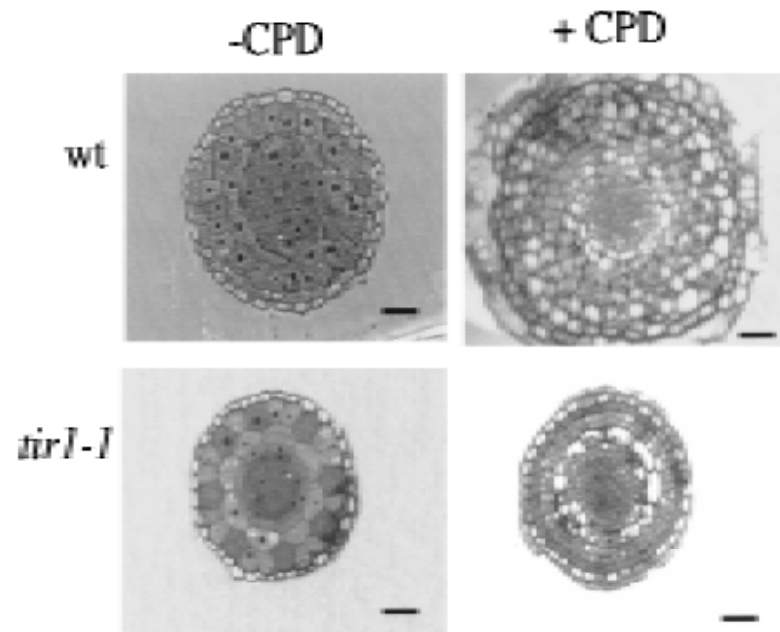
Roter Pfaden ???



Einfluss auf Zellteilung

- CPD verursacht im Wildtyp verstärkte perikline Zellteilungen im Meristem
→ im Wurzelquerschnitt sichtbar (Schwellungen)
- Untersuchungen der CPD-Wirkung auf *tir1*-Mutante
→ bei *tir1*-Mutanten nur geringfügiger Einfluss

➡ *TIR1* beeinflusst Zellteilung

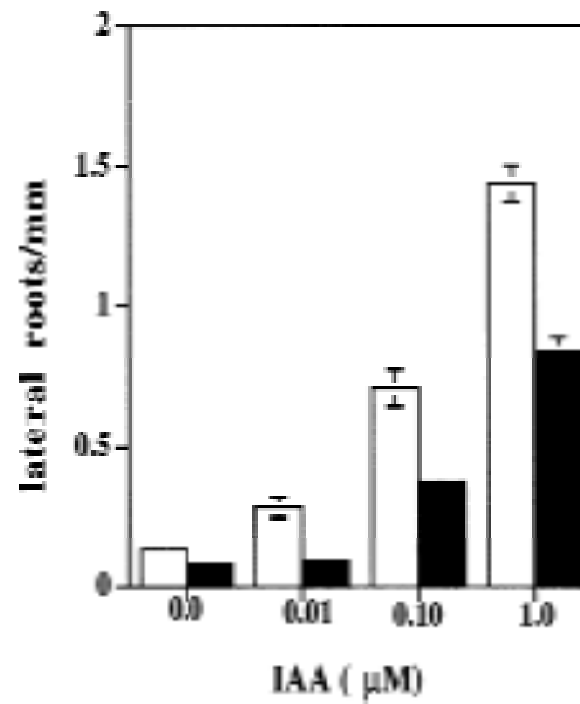


Einfluss des *TIR1* Gens auf die Seitenwurzelbildung

- Seitenwurzelanlage ist Auxin-induziert
- Anzucht von Wurzelsegmenten auf auxinhaltigem Medium

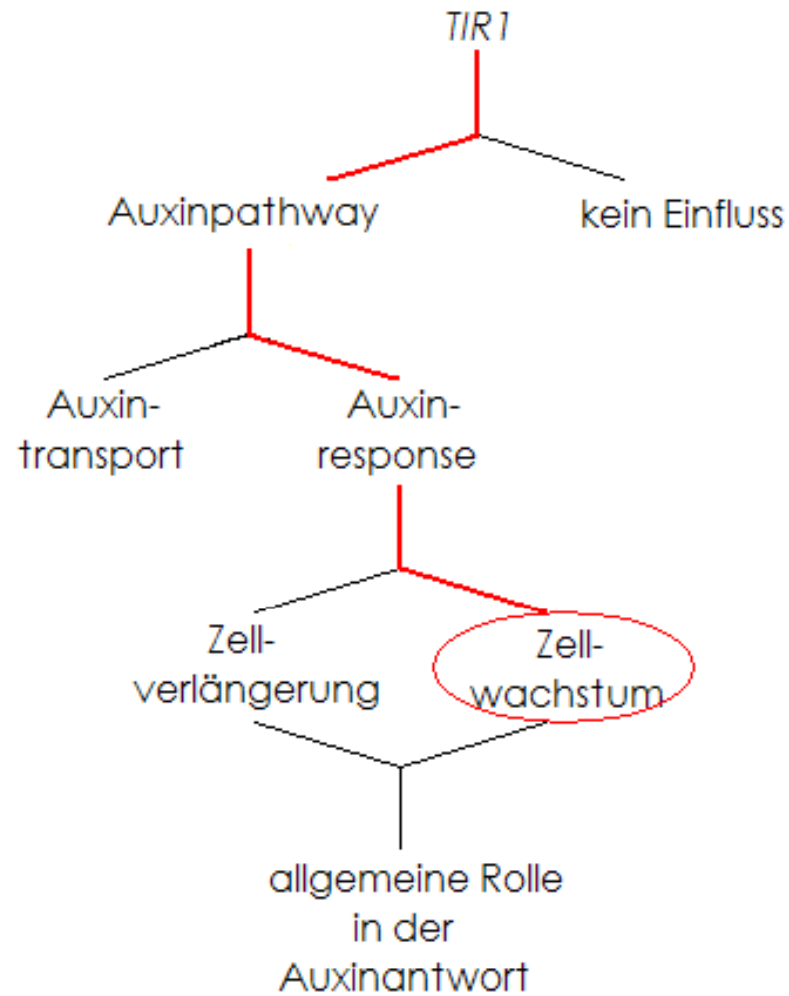
→ bei *tir1*-Mutanten fast keine Seitenwurzelbildung im Vergleich zum Wildtyp, da keine Primordien entstehen

➡ *TIR1* wirkt auf die Auxininduktion in der Seitenwurzelbildung



Weißer Balken: Wildtyp
Schwarzer Balken: *tir1*-Mutante

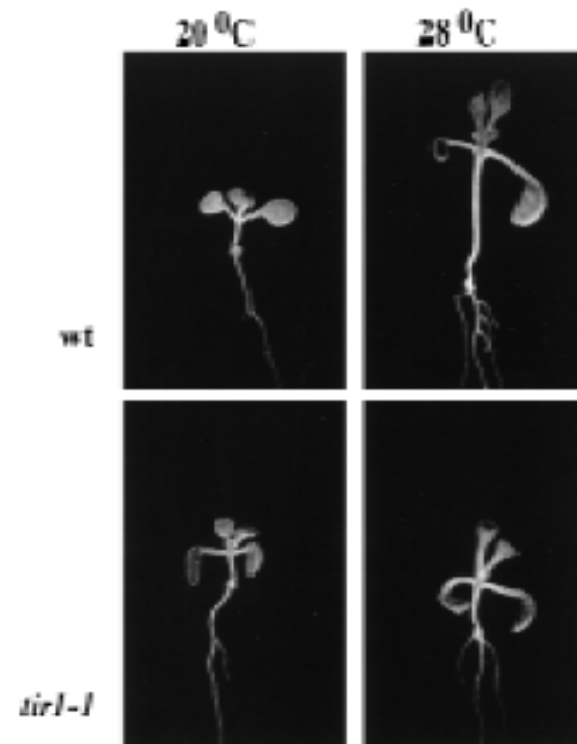
Roter Pfaden ???



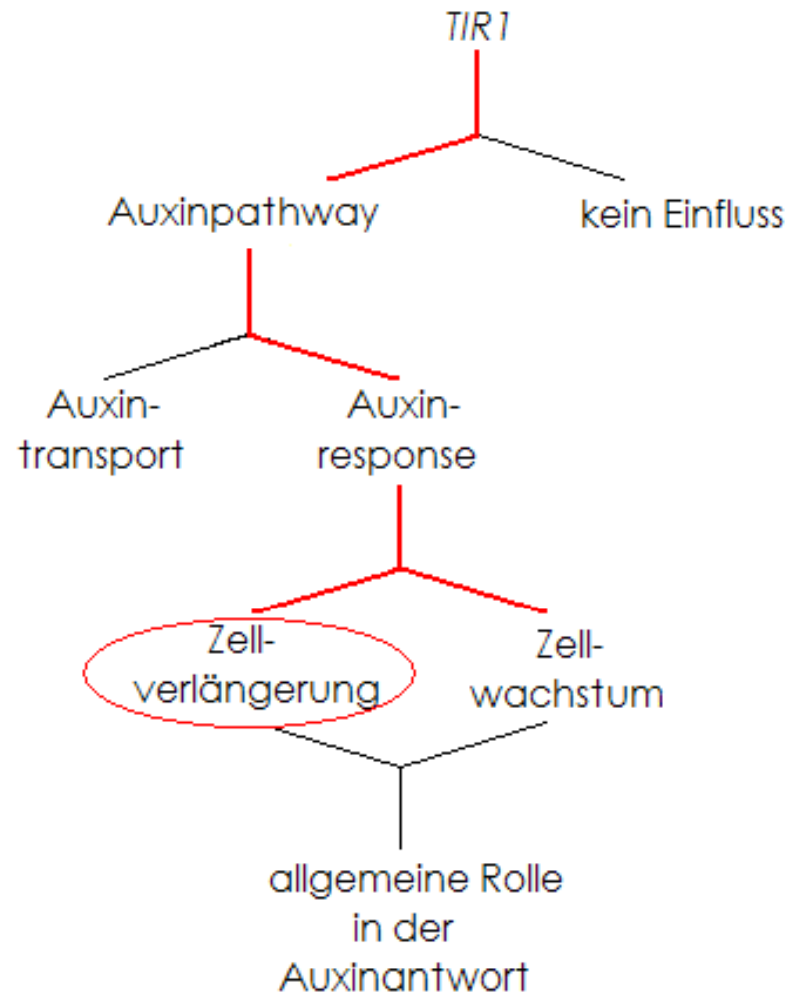
Einfluss der Temperatur auf das Pflanzenwachstum

- Temperaturerhöhung verursacht im Wildtyp Wachstum des Hypokotyls durch Epidermiszellverlängerung
- dies wird durch Auxin verursacht
- *tir1-1*-Mutanten reagieren weniger auf die Temperatur
- auch Pflanzen mit dem *iaaLys* Gen (verringertes IAA-Level) reagieren weniger auf die Temperatur

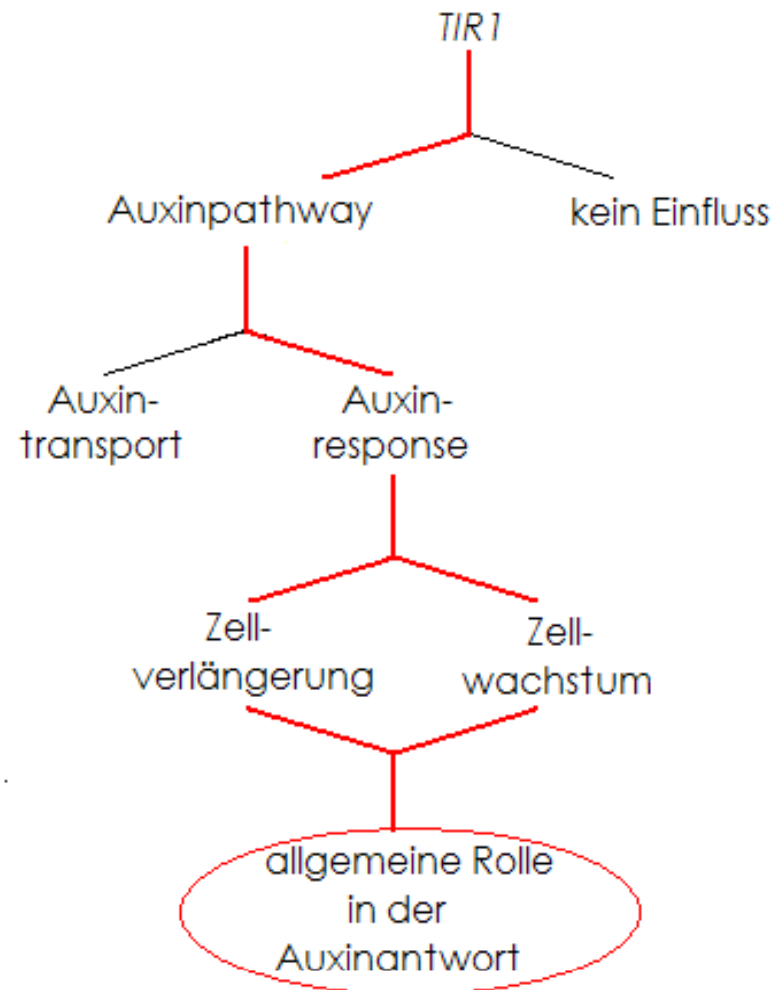
➡ *TIR1* beeinflusst Zellverlängerung



Roter Pfaden ???



Roter Pfaden..!

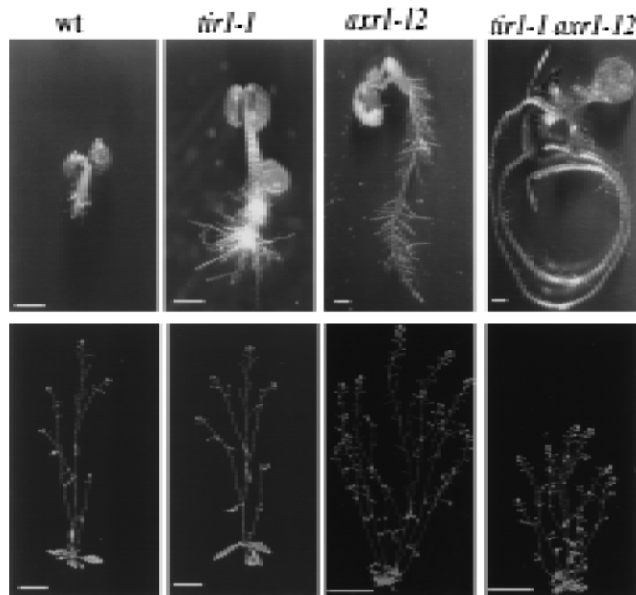


Zusammenhang zwischen AXR1 und TIR1

Begriffe:

AXR = Auxin resistant

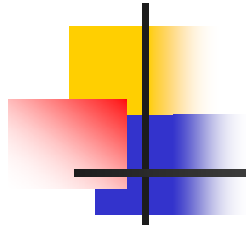
2,4-D = 2,4-Dichlorphenoxy-
essigsäure



- Generierung von Doppelmutanten, die für *tir1-1* und *axr1-12* homozygot sind, auf 2,4-D Medium

- sind resistenter gegen 2,4-D als jede der Mutationen alleine
- stärker veränderte Morphologie
- *TIR1* wirkt in *AXR1* vermittelten Prozessen
- beide verstärken einander

➡ Synergistische Interaktion

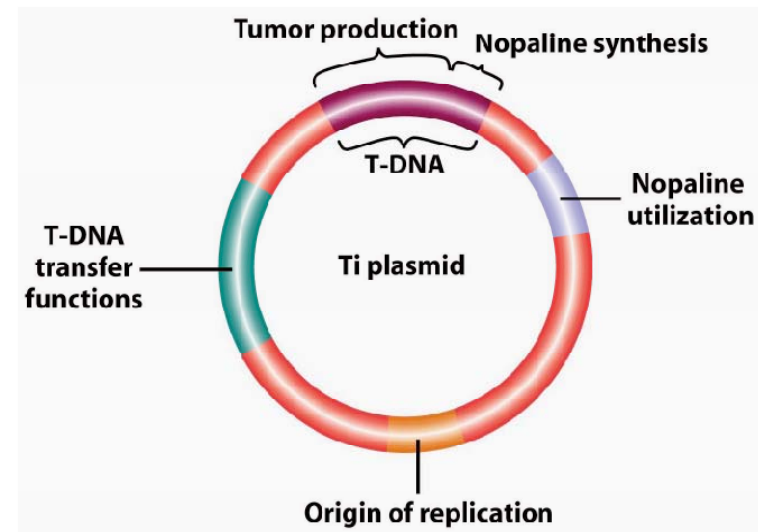


Charakterisierung von Gen und Protein

T-DNA

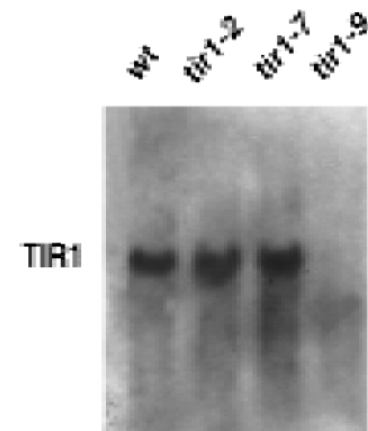
- Ti-Plasmid aus *Agrobacterium tumefaciens* und *Agrobacterium rhizogenes* wird genutzt, um bestimmte Gene in Pflanzen zu transformieren
- auf dem Ti-Plasmid befindet sich Transfer-DNA, die in das Pflanzengenom übertragen werden soll und dort zu tumorartigen Wucherungen und Krankheiten führt
- hier wird diese T-DNA ersetzt
- wenn die T-DNA in den open reading frame eines Gens eingesetzt wird, wird dieses nicht exprimiert und so ausgeschaltet (knockout)
- für *arabidopsis thaliana* gibt es die unterschiedlichsten Mutanten, die in fast jedem Gen einen knockout durch eine eingeführte T-DNA haben

Wichtige Regionen im Ti-Plasmid von *Agrobacterium*



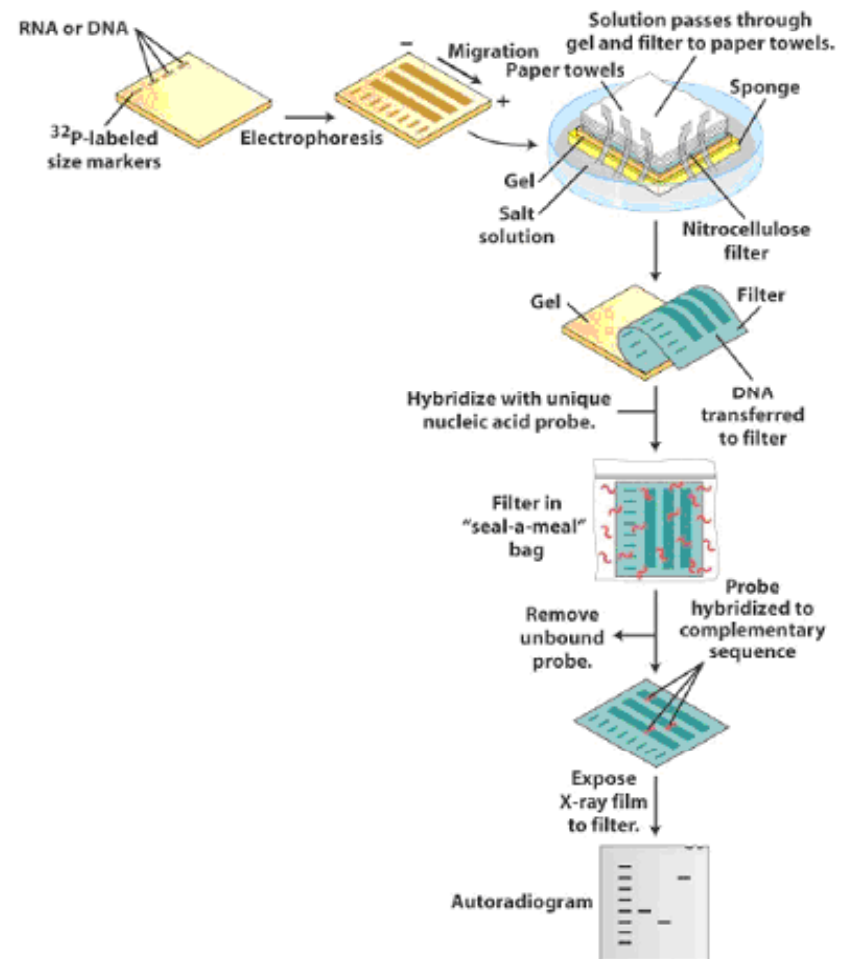
Identifizierung des *TIR1* Gens

- Verwendung von Pflanzen, die T-DNA enthalten
- Bestimmung eines T-DNA-Inserts, das mit der *tir1-9*-Mutante cosegregiert
- dieses wird geklont und mit Restriktionsenzymen geschnitten, dann das Fragment über Southern Blot ausgesucht, das sich vom Wildtyp unterscheidet
- davon werden cDNA-Klone hergestellt, wovon das längste 2,2 kB lang ist
- das klonierte Fragment enthält einen Open Reading Frame von 591 Aminosäuren
- dieses wird mithilfe von reverser transkriptase PCR sequenziert
- dabei zeigt sich, dass *tir1-1* und *tir1-2* jeweils Punktmutationen sind, bei denen ein Glycin durch ein Aspartat ersetzt wurde
- in der cDNA sind zwei Introns enthalten, die *tir1-9*-Mutante enthält in einem Intron eine T-DNA, sodass hier kein 2,2 kB Fragment entsteht (Nachweis über Northern Blot) → fehlt hier das *TIR1* Gen vollständig?
- um zu sehen, ob die Mutation wirklich im *TIR1* Gen liegt, wird eine *TIR1* cDNA hinter dem 35S-Promoter in *tir1-1*-Mutante eingeführt → wieder Wildtypphänotyp, also ist das identifizierte Gen *TIR1* und für Auxinresponse zuständig
- das Gen wird nun über restriction fragment polymorphism auf dem Chromosom lokalisiert



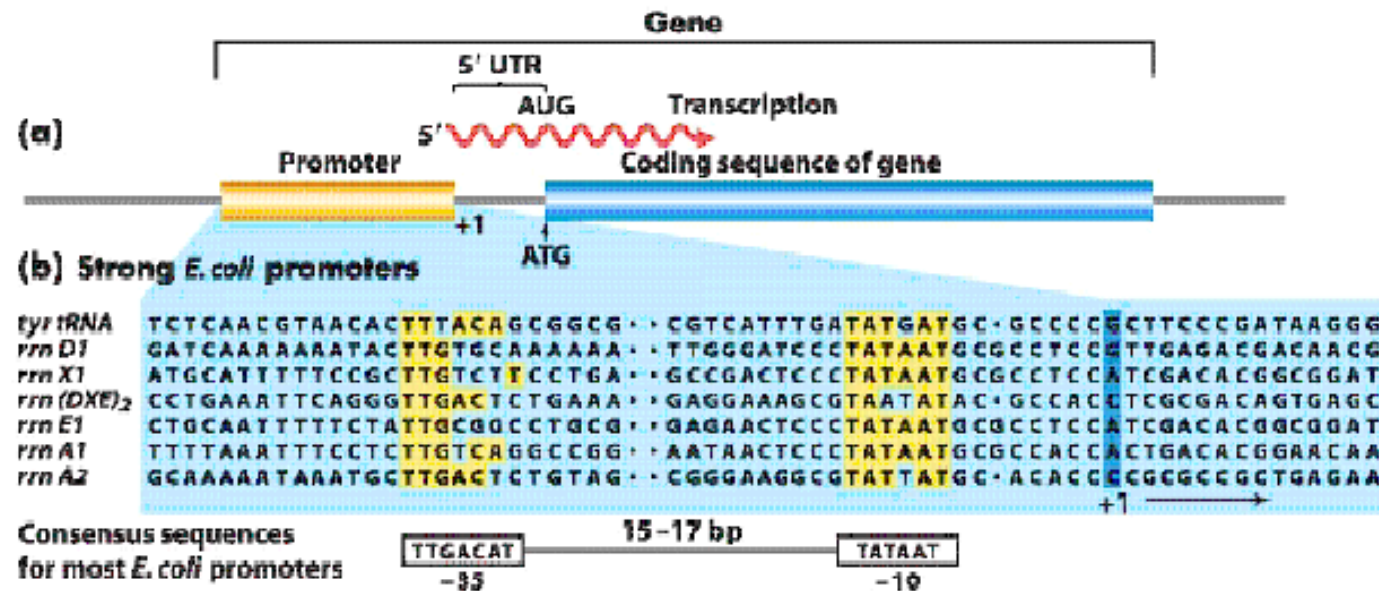
Northern Blot

- Methode zur Aufarbeitung von RNA aus Gelen
- die RNA wird aus einer Gelmatrix auf eine undurchlässige, aber bindungsaktive, Membran aus Nitrocellulose oder Nylon überführt
- ein Puffer wird durch die Saugkraft von aufgelagertem Filterpapier durch Matrix und Membran gezogen, wobei die mitgeführte RNA aus dem Gel auf die Membran übertragen und gebunden wird
- dafür müssen die Nukleinsäuren zuvor durch Alkali denaturiert worden sein
- auf der Membran ist die spezifische Markierung der RNA-Sequenzen mittels Hybridisierung mit Sonden möglich



Der 35S-Promoter

- aus dem cauliflower Mosaic Virus caMV
- führt zu Überexpression von dahinter liegenden Genen
- wird gern in das Genom von Pflanzen vor bestimmte Genabschnitte eingebaut, damit das Gen in der Pflanze stark exprimiert wird



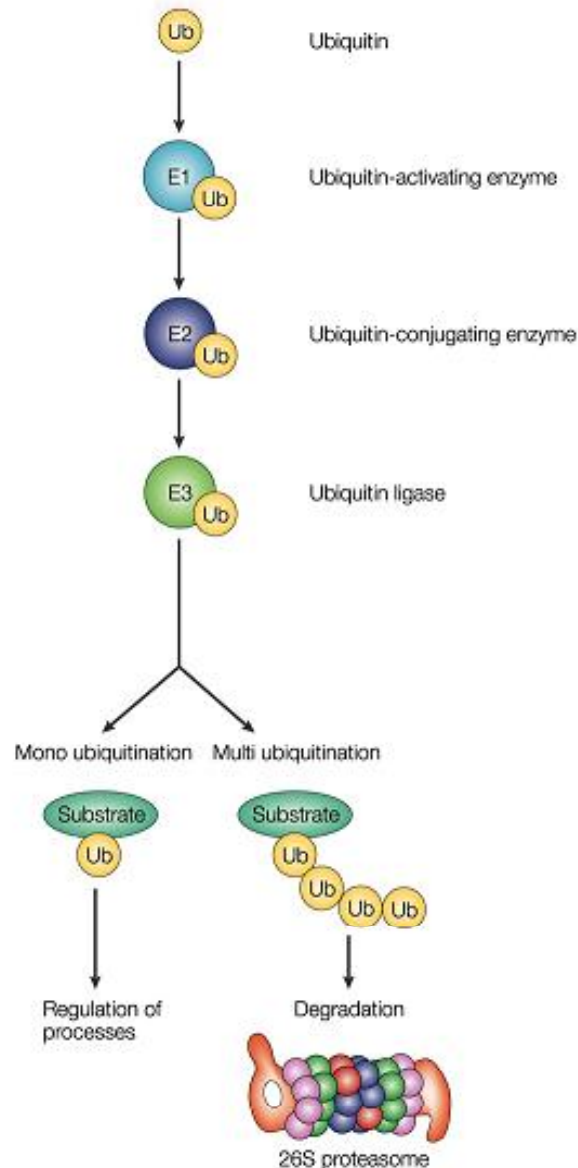
Sequenzuntersuchungen am TIR1 Protein

- enthält F-Boxdomäne
 - enthält Leucin-rich Repeats
- Ähnlichkeit mit anderen Proteinen
(werden in Pflanzen LRFs
genannt)
- binden alle an SKP1 Protein

```
95  WTEAMSSSYTWEEERIK
114  RMVVTDDCLELIAKSEKNFKVLVLSSCEGFSTD
147  GLAAIAATCRNLKEEDRESVDVDSGH
175  WLGHFEDTYTSLVSENIQCLASEVSFS
202  ALERIVTRCPNKKSEKINRAVPLEKLA
229  TILQRAPOLEELGTGGYTAEVPRDVYS
256  GLSVVLSGCKELRCLSGFWDVPA
280  YLPANYSVCSRLTTLNLSYATVQSY
305  DLVKELCQCPKLQRLWLDYIEDA
329  GLEVLASTCKDLRELRVFPSEPFVMEPNVALTEQ
363  GLVSVSMGCPKLESVLYFCRQMTNA
388  ALITLARNRPNMTRERLCIIEPKAPDYLTLEPLDI
423  GFGALVEHCKDLRRSLSGLLTDKVFE
450  YLGTYAKKMEMLSVAFAGDSDL
472  GMHHVLSGCDSLRLKEIRDCPF
494  GDKALLANASKLETMRSLWMSSCS
```

Con: .L..a...C..L..L.a.....

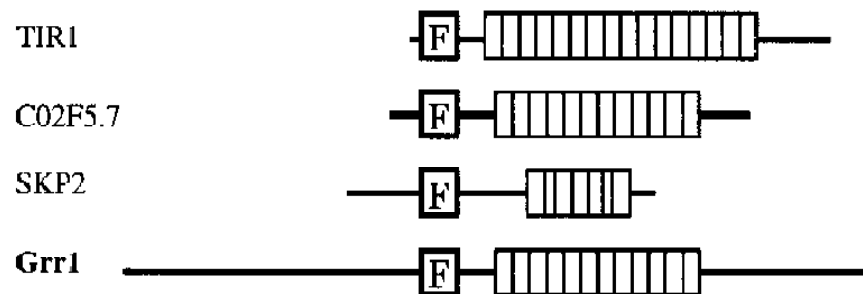
Ubiquitin-Pathway



- drei Enzyme: E₁, E₂ und E₃
- E₁ mit einem Cystein im aktiven Zentrum bildet Thioesterbindung zum Ubiquitin
- Ubiquitin wird auf E₂, Ubiquitin-konjugierendes Enzym, übertragen
- Ubiquitin-Protein-Ligase (E₃) vermittelt Isopeptidbindung von Ubiquitin an ein Lysin des Zielproteins

Diskussion

- da auch Pflanzen mit *tir1-9*-Mutation noch auf Auxin reagieren, ist TIR1 nicht essentiell für die Auxinantwort
- dennoch scheinen die Pflanzen sensitiv zur Gendosis zu sein
- eventuell übernehmen andere Proteine, wie die ähnlichen und verwandten LRFs, die Funktion von *TIR1* bei dessen Abwesenheit



Diskussion

- Dimer aus verschiedenen F-Boxproteinen (evtl. auch TIR1) und SKP1 als Komponente für Ubiquitin-Protein-Ligasen
- dabei F-Boxprotein wohl für die Spezifität
- TIR1 scheint dann mit SKP1 zu interagieren, um ein regulatorisches Protein der Auxinantwort mit Ubiquitin zu modifizieren (wirkt als E3)
- AXR1 scheint nach Dimerisierung mit einem Active-site-cystein-haltigen Protein Ubiquitin oder ein ähnliches Protein zu aktivieren (wirkt als E1)
 - das entspricht der Erwartung, dass *AXR1* und *TIR1* im selben Reaktionspfad agieren, AXR1 in der Aktivierung des Ubiquitins und TIR1 im E3 Komplex dieses Pathways
- Die Ubiquitinierung könnte ein Signal zum Abbau eines Proteins durch das Proteosom sein, oder sie verändert die Aktivität oder zelluläre Lokalisation des modifizierten Proteins
- die erste Variante würde zu einer Theorie passen, nach der die auxinregulierte Genexpression normalerweise von Repressoren gehemmt wird, deren Abbau nach der auxininduzierten Ubiquitinierung die Wirkung von Auxin möglich machen würde
- aber für genauere Theorien zum Mechanismus muss erst das Substrat für die Ubiquitinierung gefunden werden
- andere Theorie durch Ähnlichkeit von TIR1 mit Grr1p: dieses ist sowohl für den Abbau von ubiquitin-modifizierten Cyclinen wie auch für die Förderung von Glucosetransport zuständig und verbindet so die Versorgung der Zelle mit Nährstoffen mit der Zellzyklusregulation → wirkt Auxin ähnlich?